

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# 日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 2月 26日

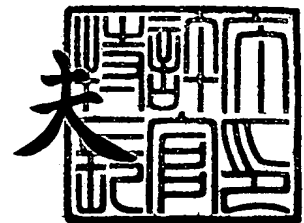
出 願 番 号  
Application Number: PCT/JPO2/01701

出 願 人  
Applicant (s): 天野エンザイム株式会社  
松村 康生  
森 友彦

2003 年 10 月 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証平 15-500279

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年02月25日（25.02.2002）月曜日 10時17分33秒

P0101701

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	PCT/JP02/01701
0-2	国際出願日	26.02.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	P0101701
I	発明の名称	乳蛋白質の脱アミド化方法及び乳蛋白質の変性方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	天野エンザイム株式会社
II-4en	Name	AMANO ENZYME INC.
II-5ja	あて名:	460-0003 日本国 愛知県 名古屋市 中区錦一丁目2番7号
II-5en	Address:	2-7, Nishiki 1-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-0003 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4j a	氏名(姓名)	松村 康生
III-1-4e n	Name (LAST, First)	MATSUMURA, Yasuo
III-1-5j a	あて名:	611-0011 日本国 京都府 宇治市 五力庄 京都大学大学院農学専攻品質科学講座品質 評価学分野内
III-1-5e n	Address:	Laboratory of Quality Analysis and Assessment, Division of Agronomy and Horticultural Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Gokasho Uji-shi, Kyoto 611-0011 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4j a	氏名(姓名)	森 友彦
III-2-4e n	Name (LAST, First)	MORI, Tomohiko
III-2-5j a	あて名:	611-0011 日本国 京都府 宇治市 五力庄 京都大学大学院農学専攻品質科学講座品質 評価学分野内
III-2-5e n	Address:	Laboratory of Quality Analysis and Assessment, Division of Agronomy and Horticultural Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Gokasho Uji-shi, Kyoto 611-0011 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	小西 富雅
IV-1-1en	Name (LAST, First)	KONISHI, Tomimasa
IV-1-2ja	あて名:	460-0002 日本国 愛知県 名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エスレートビル 7階
IV-1-2en	Address:	7F Marunouchi Estate Bldg. 17-12, Marunouchi 2-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-0002 Japan
IV-1-3	電話番号	052-201-2055
IV-1-4	ファクシミリ番号	052-201-2056

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年02月25日（25.02.2002）月曜日 10時17分33秒

P0101701

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	萩野 幹治
IV-2-1en	Name(s)	HAGINO, Mikiharu
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国であ る他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約 国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張	
VI-1-1	出願日	2001年02月27日 (27.02.2001)
VI-1-2	出願番号	特願2001-052918
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関(TSA )	日本国特許庁 (ISA/JP)

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年02月25日（25.02.2002）月曜日 10時17分33秒

VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	-
IX-2	明細書	19	-
IX-3	請求の範囲	3	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	4	-
IX-7	合計	32	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フルキップディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振り込みを証明する書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番号	なし	
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	小西 富雅	
X-2	提出者の記名押印		
X-2-1	氏名(姓名)	萩野 幹治	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2002.02.20
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

P0101701

原本（出願用） - 印刷日時 2002年02月25日（25.02.2002）月曜日 10時17分33秒

10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	
------	----------------------------------	--

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## 明 細 書

### 乳蛋白質の脱アミド化方法及び乳蛋白質の変性方法

#### 5 技術分野

本発明は、蛋白質のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を利用した乳蛋白質の脱アミド化方法及び脱アミド化乳蛋白質の製造方法に関する。また、当該酵素を用いた乳蛋白質の変性方法及び蛋白質分解物の製造方法に関する。

10

#### 背景技術

一般に、蛋白質中のグルタミン及びアスパラギン残基を脱アミド化してカルボキシル基を生じさせると、その蛋白質の負電荷が増加し、その結果等電点が低下、水和力が増加する。さらに静電反撥力の上昇による蛋白質間の相互作用の低下  
15 すなわち会合性の低下がもたらされる。これらの変化により蛋白質の可溶性、水分散性は大きく増大する。また、蛋白質の負電荷の増加はその蛋白質の折りたたみをほぐし、高次構造を変化させ、分子内部に埋もれていた疎水性領域を分子表面に露出させる。したがって、脱アミド化蛋白質は両親媒性を有し理想的な界面活性剤となり、蛋白質の乳化力、乳化安定性、起泡性、及び泡沫安定性が大きく  
20 向上する。

このように、蛋白質の脱アミド化は蛋白質の様々な機能特性の向上をもたらし、その蛋白質の用途は飛躍的に増大する（例えば Molecular Approaches to Improving Food Quality and Safety, D. Chatnagar and T. E. Cleveland, eds., Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, p. 37）。

25 蛋白質を酵素的に脱アミド化する方法として、高pH (pH10)条件下でのプロテ



アーゼ処理法(A. Kato, A. Tanaka, N. Matsudomi, and K. Kobayashi, J. Agric. Food Chem., 35, 224, 1987)、トランスグルタミナーゼ法(M. Motoki, K. Seguro, A. Nio, and K. Takinami, Agric. Biol. Chem., 50, 3025, 1986)、ペプチドグルタミナーゼ法(UP 5082672A 及びJ.S. Hamada, and W.E. Marshall, J. Food Sci., 54, 598, 1989)の三つの方法が知られているが、以下のよう  
5 な問題点が指摘されている。

プロテアーゼ法では、その本来の反応であるペプチド結合の切断は避けられず、これにより脱アミド化により期待される蛋白質の機能性の向上が阻害される（特に泡沫安定性が低下する）。また、苦味の生成ももたらされる。

10 トランスグルタミナーゼ法では、その本来の反応であるグルタミンとリジン間でのイソペプチド結合の形成による架橋反応を押さえるためには、予めリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基を化学的に保護しておく必要がある。したがって、この方法により食品用の脱アミド化蛋白質を生産する場合には、可逆的保護基であるシトラコニル基などで保護しておいた後グルタミンを脱アミドさせ、その後保護基をはず  
15 し、さらに遊離したシトラコニル酸と脱アミド化蛋白質を分離しなければならなかった。このように、製造工程が煩雑であり、またコスト面からも好ましくなく実用化にはほど遠いものであった。

一方、ペプチドグルタミナーゼ法では、本酵素が本来低分子化されたペプチドの脱アミド化をもっぱら触媒する酵素であるため、そのままの状態の蛋白質には  
20 作用させることが出来ず（M. Kikuchi, H. Hayashida, E. Nakano, and K. Sakaguchi, Biochemistry, 10巻, 1222-1229, 1971及びB. P. Gill, A. J. O'Shaughnessey, P. Henderson and D. R. Headon, Jr. J. Food Sci. Technol., 9巻, 33-41, 1985）、蛋白質加水分解物を用いる必要があった（UP 5082672A 及びJ.S. Hamada, and W.E. Marshall, J. Food Sci., 54, 598, 1989）。即ちブ  
25 ロテアーゼとの併用を余儀なくされ、上記のプロテアーゼ法の場合と同様に苦味

ペプチドの生成、機能性、特に泡沫安定性の低下という問題を生じる。

これらの問題を解決する方法として、蛋白質に直接作用して脱アミドする作用を有する酵素（蛋白質脱アミド酵素）を用いた蛋白質の脱アミド化法が開示されている（特開 2000-50887 号公報）。

- 5 一方、熱処理、変性剤の処理などにより蛋白質を変性させる方法が知られている。蛋白質を変性させることの意義は、蛋白質分解酵素感受性の向上や消化性の向上、あるいは乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性など蛋白質の機能性の向上などが挙げられる。従来においては、物理的方法、化学的方法により蛋白質の変性を行うことが一般的であった。物理的方法には、熱処理、高圧処理などがある。化学的方法には、変性剤（尿素、塩酸グアニジン）、還元剤、酸化剤、酸処理、アルカリ処理などがある。
- 10

#### 発明の開示

- 上述のように、蛋白質の脱アミド化をする方法として 4 つの方法が提案されている。中でも、蛋白質に直接作用して脱アミド化する作用を有する酵素（蛋白質脱アミド酵素）を用いた脱アミド化法は、予め蛋白質を分解処理或いは化学修飾する必要がなくそのままの状態の蛋白質を用いて脱アミド化できるため、他の 3 つの方法に比較して優れた方法であるといえる。
- 15

- しかしながら、当該酵素の作用について検討したところ、ほとんどの蛋白質に作用して脱アミド化することが出来るものの、蛋白質の種類によって脱アミド化速度や脱アミド化率が異なっており、一部の蛋白質に対しては十分な脱アミド化効果が得られないことが観察された。即ち、脱アミド化速度や脱アミド化率において改善の余地があるものであった。
- 20

- 本発明の第 1 の局面は以上の課題に鑑みなされたものであり、蛋白質中のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わずに脱アミドす
- 25

る作用を有する蛋白質を用いた脱アミド化方法において、脱アミド化速度及び脱アミド化率を改善することを目的とする。

一方、上記のように蛋白質の変性方法は物理的方法又は化学的方法によるものが一般的であった。物理的又は化学的な変性方法では、蛋白質の分解や蛋白質の側鎖の破壊、或いは蛋白質の凝集・不溶化を伴い、食品工業などの産業での利用にあたってしばしば問題になっていた。そこで、酵素を用いた蛋白質の変性方法が模索されている。酵素を用いた方法は、物理・化学的方法に比べ反応の選択性が高く、また温和な条件で行う事が出来るため、望ましくない副反応が伴わず、またエネルギー消費が少なくて済むなどの理由により、物理・化学的方法に勝っているといえる。とりわけ、温和な条件で行うことの出来る酵素的変性方法は、好ましくない副反応、過剰な変性を伴わないという利点、或いは、乳化特性、泡沫特性などの機能性を発揮するために好適な変性状態をもたらすことが期待できるなど、産業上大きな利用価値がある。しかしながら、現状においては適当な酵素的変性方法は知られていない。

15 本発明の第2の局面は以上の課題に鑑みなされたものであり、酵素を用いた蛋白質の変性方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記本発明の第1の局面における課題に鑑み種々の検討を行った。まず、上記の蛋白質脱アミド酵素を直接作用させた場合には十分な脱アミド化効果が得られなかった蛋白質である $\alpha$ -ラクトグロブリンを対象として脱アミド化速度、及び脱アミド化率の向上を試みた。その結果、脱アミド化の際に予め変性処理を行った $\alpha$ -ラクトグロブリンを用いることにより、脱アミド化速度及び最終的な脱アミド化率が著しく向上することを見出した。本発明の第1の局面は、かかる知見に基づくものであり、その構成は次の通りである。即ち、

変性蛋白質（変性乳蛋白質など）に、蛋白質のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用さ

せる、ことを特徴とする蛋白質（乳蛋白質など）の脱アミド化方法である。

また、本発明者は、蛋白質脱アミド酵素によって脱アミド化された蛋白質の性状について検討した。そして、分光光学的手法による分析の結果、脱アミド化された蛋白質は3次構造が大きく破壊されていること、即ち変性されていることを見出した。また、この脱アミド化された蛋白質は、3次構造が崩れているのに対し2次構造は保持されていることを見出した。この様な変性状態は、乳化特性、泡沫特性などの機能性を発揮するために好適な構造であることが知られている（D. Panyam and A. Kilala, Trends in Food Sci. Tech., Vol.7, 120-125, 1996）。さらに、脱アミド化された蛋白質は、蛋白質分解酵素に対する感受性において著しく改善されていることを見出した。本発明の第2の局面は以上の知見に基づき完成されたものであり、次の構成からなる。即ち、

蛋白質（乳蛋白質など）に、蛋白質のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させる、ことを特徴とする蛋白質（乳蛋白質など）の変性方法である。

15

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例2における変性状態及び未変性状態の $\alpha$ -ラクトアルブミンの蛋白質脱アミド酵素による脱アミド化反応のタイムコースを示す図である。

●は未変性 $\alpha$ -ラクトアルブミン、○は変性 $\alpha$ -ラクトアルブミンを表す。

図2は、実施例3における脱アミド化 $\alpha$ -ラクトアルブミンの近紫外領域円二色分析スペクトラムを示す図である。

Aは、2 mM エチレンジアミン四酢酸存在下、Bは2 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下のグラフであり、Native は未変性 $\alpha$ -ラクトアルブミン、D20 は脱アミド化率20%の脱アミド化 $\alpha$ -ラクトアルブミン、D55 は脱アミド化率55%の脱アミド化 $\alpha$ -ラクトアルブミン、D61 は脱アミド化率61%の脱アミド化 $\alpha$ -ラクトアルブミンを

25

表す。

図 3 は、実施例 3 における脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミンの遠紫外領域円二色分析スペクトラムを示す図である。

A は、2 mM エチレンジアミン四酢酸存在下、B は 2 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下のグラフであり、Native は未変性  $\alpha$ -ラクトアルブミン、D20 は脱アミド化率 20% の脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミン、D55 は脱アミド化率 55% の脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミン、D61 は脱アミド化率 61% の脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミンを表す。

図 4 は、実施例 4 におけるトリプシン処理した脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのタイムコースを示す図である。

A は未処理の  $\alpha$ -ラクトアルブミン、B は脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミンを表す。レーン 1、2、3、4、5 はそれぞれ、トリプシン処理時間 0.5、1、2、4、24 時間のサンプルを表す。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明の第 1 の局面は、変性蛋白質（変性乳蛋白質など）に、蛋白質のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させる、ことを特徴とする蛋白質（乳蛋白質など）の脱アミド化方法である。

20

本発明における変性蛋白質は、未変性の蛋白質を公知の変性方法によって変性させることにより調製することができる。変性方法としては、例えば、物理的変性方法である熱、圧力等による処理、化学的変性方法である酸、アルカリ、変性剤（尿素、塩酸グアニジン、界面活性剤など）、酸化剤、還元剤、キレート剤等による処理を挙げることができる。これらの処理は単独で行うことができることは

25

勿論のこと、これら中から任意に選択される二以上の処理を同時又は時間をおいて行うこともできる。例えば、蛋白質溶液に変性剤を添加し、熱を加える。これにより、変性剤による変性処理及び熱による変性処理が同時に行われる。

尚、変性処理の方法は、変性させる蛋白質の種類、必要な変性の程度等を考慮して選択することができる。

変性蛋白質の調製を、後述の蛋白質脱アミド酵素の反応と同時に行うこともできる。例えば、蛋白質を含む溶液に変性剤及び後述の蛋白質脱アミド酵素を添加し、変性剤の存在下で後述の蛋白質脱アミド酵素による反応を行う。

本明細書における蛋白質には、アミノ酸残基のみからなる単純蛋白質だけでなく、糖、脂質等との複合体である複合蛋白質等も含まれる。また、分子量に関しては、好ましくは 5,000 以上、特に好ましくは 10,000~2,000,000 である。

例えば、植物性蛋白質であれば豆類、穀類由来の蛋白質、動物性蛋白質であればカゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリンなどの乳蛋白、オボアルブミンなどの卵蛋白、ミオシン、アクチンなどの肉蛋白、血清アルブミンなどの血液蛋白、ゼラチン、コラーゲンなどの腱蛋白質があげられる。また、酸、アルカリなどによる化学的、あるいはプロテアーゼなどによる酵素的部分分解蛋白質や、各種試薬による化学修飾蛋白質であってもよい。

本発明の方法に用いられる酵素（以下、「蛋白質脱アミド酵素」という）は、蛋白質のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用（以下、「蛋白質脱アミド作用」という）を有する。当該作用を有する限りにおいてその種類は特に限定されるものではない。

本発明における蛋白質脱アミド酵素として、分子量が 5,000 以上の蛋白質（変性蛋白質）に対して脱アミド化作用を有するものが好ましく、特に好ましくは分子量が 10,000 以上~2,000,000 の範囲の蛋白質（変性蛋白質）に対して脱アミド化作用を有するものが用いられる。

- 蛋白質脱アミド酵素は、蛋白質脱アミド酵素を産生する微生物の培養液より調製したものを用いることができる。蛋白質脱アミド酵素の調製に用いられる微生物は特に限定されないが、その培養液中に当該酵素を産生する微生物であって、例えば、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属に属する微生物を用いることができる。特に、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属に属するクリセオバクテリウム・エスピー (*Chryseobacterium* sp.) No.9670 を蛋白質脱アミド酵素の調製に用いることが好ましい。クリセオバクテリウム・エスピー (*Chryseobacterium* sp.) No.9670 は、受託番号 FERM BP-7351 (2000年(平成12年)1月8日付の移管請求に基づき受託番号 FERM P-17664 の国内寄託から移管) で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現在は経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所) に寄託されている。
- 上記の微生物の培養液から蛋白質脱アミド酵素を調製する方法は、公知の蛋白質分離、精製方法 (遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー等) を用いることができる。例えば、培養液を遠心分離して菌体を除去し、その後塩析、クロマトグラフィー等を組み合わせて目的の酵素を得ることができる。
- 本発明では、上記の変性蛋白質に上記の蛋白質脱アミド酵素を作用させる。変性蛋白質は溶液又はスラリーあるいはペースト状で反応に供される。また、変性蛋白質を含む溶液等は、水溶液に限らず油脂とのエマルジョンであってもよい。さらに、溶液中に他の蛋白質、塩類、糖類、香料、保湿剤、着色料などが添加されていてもよい。尚、変性蛋白質を含む溶液は、未変性の蛋白質が含まれる溶液において当該蛋白質を変性させること、又は変性蛋白質を予め調製してこれを適

当な溶媒に溶解させることにより調製することができる。

蛋白質脱アミド酵素の反応条件（酵素量、反応の時間、温度、反応溶液の pH など）は、特に限定されないが、通常、蛋白質 1 g に対し、0.1～100 ユニット、好ましくは 1～10 ユニット、反応温度は通常、5～80℃、好ましくは 20～60℃、

- 5 反応溶液の pH は通常、2～10、好ましくは 4～8 で 10 秒～48 時間、好ましくは 10 分～24 時間反応させる。また、これらの条件は、使用する酵素の純度や変性蛋白質の種類、純度などに応じて適宜変更して行うことができる。

- 10 以上のように、変性蛋白質に蛋白質脱アミド酵素を作用させることにより、変性蛋白質中のアミド基を直接脱アミド化することができる。その結果、生じた脱アミド化蛋白質は高度に脱アミド化されたものであり、負電荷の増加に伴い、pI の低下、水和力の上昇、静電反発力の上昇がもたらされる。更に蛋白質の高次構造の変化により、表面疎水性の上昇がもたらされる。これらの効果により、可溶性・分散性の向上、起泡性・泡沫安定性の向上、乳化性・乳化安定性の向上など、蛋白質の機能性の改善がもたらされる。

- 15 このように機能性が改善された蛋白質は、主として食品分野での用途が大きく拡大する。多くの植物性蛋白質は、特に通常の食品の pH 範囲である弱酸性において、可溶性、分散性、乳化性などの機能性が乏しいため、多くの食品例えばコーヒー・ホワイトナー、ジュースなどの酸性飲料、ドレッシング、マヨネーズ、
- 20 クリームなどへの使用が制限されていた。しかしながら、例えば小麦グルテンなどの植物性難溶解性蛋白質を本発明の方法により脱アミド化することにより、可溶性、分散性が増大し、これまで使用に適さなかったこれらの食品への使用が可能となり、また分散性の高い天ぷら粉としても使用できる。

また、製パン・製菓におけるドウの改質のためにも本発明の方法が使用できる。

- 例えばグルテン含量が高いドウは伸展性が低く、ドウのハンドリング性や機械特性に問題があり、また出来上がったパンの体積や品質にも問題があった。グルテ
- 25



ンを本発明の方法により脱アミド化することにより、伸展性が向上し、これらの問題を改善することが出来る。また脱アミド化グルテンが乳化剤としての効果も示し、日持ち性、ソフトネスなどの製パン特性も向上する。さらに脱アミド化グルテンを含むドウは、可塑性が低く伸展性に優れているため、クラッカー、ビスケット、クッキー、ピザや或いはパイのクラストの製造にふさわしく、これらの製造にも本発明の方法が使用できる。

またさらに、食品中の蛋白質に起因するアレルギー、不耐症或いは遺伝的疾患などの原因となる蛋白質を本発明の方法により処理し、その毒性、アレルギー性を除去、低減化することが出来る。

10 またさらに、本発明の方法により蛋白質のミネラル感受性を低下させ、蛋白質・ミネラル溶液中の可溶性ミネラル含量を高め、ミネラルの人体への吸収性を高めることが出来る。一般に食品中のカルシウムの人体への吸収性は、カルシウムを有機酸やカゼインホスホペプチドを用いて可溶化させると向上することはよく知られている。同じメカニズムにより、本発明の方法により蛋白質を脱アミド化させることにより、多量のカルシウムを可溶化させることが可能である。この脱アミド化蛋白質を用いて、高ミネラル（例えばカルシウム）含有飲料や、ミネラル（例えばカルシウム）の吸収促進剤を製造することもできる。

さらに、アミノ酸系調味料（動物性蛋白質の加水分解物（HAP）、植物性蛋白質の加水分解物（HVP））或いは味噌・醤油製造においては、苦味の低下、プロテアーゼの蛋白質分解率の向上、グルタミン酸含量の増強などの効果がもたらされる。一般に苦味の原因は疎水性ペプチドに由来することは周知のとおりであり、脱アミドにより苦味ペプチドの低減化がもたらされる。N末端にグルタミン酸を有するペプチドは苦味のマスキング効果を有することも知られている。

またさらに蛋白質の機能改変に本発明を利用することができる。脱アミド化する蛋白質が酵素である場合は、その酵素の酵素化学的、物理化学的性質を改変す

ることが出来る。例えば酵素蛋白質を本発明の方法により脱アミドすることにより、酵素蛋白質の等電点が低下し pH 安定性を改変することが出来る。また、活性部位の構造や電氣的環境を変化させることにより、その酵素の基質親和性、基質特異性、反応速度、pH 依存性、温度依存性、温度安定性などを改変することが出来る。

5 出来る。

またさらに穀類、豆類蛋白質の抽出・濃縮効率の向上などに利用できる。一般に小麦、大豆など穀類や豆類の蛋白質は水に不溶性の蛋白質が多く、蛋白質を抽出することは容易ではないが、小麦粉や大豆粉の懸濁液に本発明の方法を適用し可溶化すれば、蛋白質を容易に抽出することが出来、また高含量の蛋白質単離物を

10 得ることが出来る。

大豆蛋白質の場合、一般に、脱脂大豆粉またはフレーク（蛋白質含量約 50%）から蛋白質を抽出する際には、まず熱処理やエタノール処理或いは pH 4.5 付近の等電点処理により蛋白質を不溶化させた後、可溶性の多糖を除いて蛋白質含量約 70% の大豆蛋白質濃縮物（コンセントレート）が得られる。さらに高純度の蛋白質が望まれる場合は、大豆粉や濃縮物を希釈アルカリに懸濁・溶解し蛋白質を溶解させ不溶性の物質を除いて調製される。このものは大豆蛋白質単離物（アイソレート）と呼ばれ蛋白質を約 90% 含む。これらの大豆蛋白質製品は、大豆蛋白質の乳化性、ゲル化特性、保水性等の機能性や高栄養価を利用して、ハム・ソーセージや乳児用食品をはじめ様々な食品に利用されている。

15

20 これらの大豆蛋白質製品を製造する際に本発明を適用すれば、蛋白質の溶解性の向上により収率の向上ばかりでなくより高濃度の蛋白質製品を製造することが出来る。さらにこのようにして得られた蛋白質製品は、脱アミド化されているため機能性に優れている。従って、畜肉、魚肉製品、麺類など種々の食品に使用した場合優れた効果を示し、また新しいテクスチャーや機能を有する食品の製造が可能となる。

25

尚、本発明の第 1 の局面には、蛋白質（乳蛋白質など）を変性させるステップ、及び前記ステップで得られる変性蛋白質（変性乳蛋白質など）に、蛋白質のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させて前記変性蛋白質（変性乳蛋白質など）を脱アミド化するステップ、を含むことを特徴とする脱アミド化蛋白質の製造方法が包含される。

次に、本発明の第 2 の局面について説明する。上述のように、本発明の第 2 の局面は、蛋白質（乳蛋白質など）に、蛋白質のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させる、ことを特徴とする蛋白質（乳蛋白質など）の変性方法である。

ここでの蛋白質のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素とは、上述の蛋白質脱アミド酵素のことであり、本発明の第 1 の局面と同様に、分子量が 5,000 以上の蛋白質（変性蛋白質）に対して脱アミド化作用を有するものが好ましく、特に好ましくは分子量が 10,000 以上～2,000,000 の範囲の蛋白質に対して脱アミド化作用を有するものが用いられる。蛋白質脱アミド酵素の作用、調製方法等については、上述の通りである。

本発明の第 2 の局面では、この蛋白質脱アミド酵素を蛋白質に作用させることにより、蛋白質を脱アミド化して変性させる。ここでの蛋白質は、本発明の第 1 の局面の場合と同様に、アミノ酸残基のみからなる単純蛋白質だけでなく、糖、脂質等との複合体である複合蛋白質等も含まれる。また、分子量に関しては、好ましくは 5,000 以上、特に好ましくは 10,000～2,000,000 である。例えば、植物性蛋白質であれば豆類、穀類由来の蛋白質、動物性蛋白質であればカゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリンなどの乳蛋白、オボアルブミンなどの卵蛋白、ミオシン、アクチンなどの肉蛋白、血清アルブミンなどの血液蛋白、ゼラチン、コラーゲンな

どの鍵蛋白質があげられる。また、酸、アルカリなどによる化学的、あるいはプロテアーゼなどによる酵素的部分分解蛋白質や、各種試薬による化学修飾蛋白質であってもよい。

- 5 蛋白質は溶液又はスラリーあるいはペースト状で反応に供される。また、蛋白質を含む溶液等は、水溶液に限らず油脂とのエマルジョンであってもよい。さらに、溶液中に他の蛋白質、塩類、糖類、香料、保湿剤、着色料などが添加されていてもよい。

- 10 蛋白質脱アミド酵素の反応条件（酵素量、反応の時間、温度、反応溶液のpHなど）は、特に限定されないが、通常、蛋白質1gに対し、0.1～100 ユニット、好ましくは1～10 ユニット、反応温度は通常、5～80℃、好ましくは20～60℃、反応溶液のpHは通常、2～10、好ましくは4～8で10秒～48時間、好ましくは10分～24時間反応させる。また、これらの条件は、使用する酵素の純度や蛋白質の種類、純度などに応じて適宜変更して行うことができる。

- 15 以上のように、蛋白質に蛋白質脱アミド酵素を作用させることにより、蛋白質の変性が行われる。即ち、変性蛋白質が得られる。この変性蛋白質は、蛋白質分解酵素に対して感受性の高いものである。したがって、この変性蛋白質に蛋白質分解酵素を作用させれば、効率よく蛋白質分解物を得ることができる。このような蛋白質分解物の製造方法も本発明に含まれるものであり、具体的には、上記の方法により蛋白質を変性させるステップ、前記ステップで得られる変性蛋白質に  
20 蛋白質分解酵素を作用させるステップ、を含むことを特徴とする蛋白質分解物の製造方法も本発明に含まれる。

- 25 蛋白質分解酵素としては、ペプシン、トリプシン、パパイン等の公知のものを使用することができる。使用する蛋白質分解酵素は、分解対象の蛋白質の種類、蛋白質分解物の性状等を考慮して適宜選択することができる。蛋白質分解酵素の反応条件（酵素量、反応の時間、温度、反応溶液のpHなど）も同様に、分解対象

の蛋白質の種類、状態、及び量等を考慮して適宜設定することができる。

本発明の第2の局面の方法は、第1の局面の発明と同様に、食品中の蛋白質の可溶性、分散性、起泡性、泡沫安定性、乳化性、乳化安定性といった機能の向上を目的として各種食品に適用することができる。また、製パン・製菓食品中の蛋白質のアレルゲン性の除去、低減にも利用できる。更に、アミノ酸系調味料等の味質の改良にも利用できるものである。

一方、本発明の第2の局面の方法を適用すれば、蛋白質の蛋白分解酵素に対する感受性を高めることができるため、酵素的 HAP(動物性蛋白質の加水分解物)、植物性蛋白質の加水分解物(HVP)製造において問題の一つであった低分解率を改善することも出来る。

以下に、本発明の第1の局面及び第2の局面を実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### [実施例1] 蛋白質脱アミド酵素の調製

15 クリセオバクテリウム・エスピー No.9670(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号 FERM BP-7351)を LB Base 培地、25℃で培養した、40時間培養液を 4℃、12000 rpm(22200 × g)、20分間の遠心分離により菌体を除去し、得られた遠心上清を、限外濾過膜(SEP-0013、旭化成製)により約25倍に濃縮後、凍結乾燥して粗酵素粉末を得た。これに、2.0 M NaClを含む 10 mM

20 燐酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に溶解し、不溶物を 4℃、10000 rpm(12300 × g)、15分間の遠心分離により除いた後、得られた遠心上清を、2.0 M NaClを含む 10 mM 燐酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)で平衡化したフェニルセファロース CL-6B カラム(ファルマシア社製)に供し、2.0 M から 0 M の NaCl 直線濃度勾配により吸着した蛋白質を溶離させた。

25 蛋白質脱アミド活性画分を集め、限外濾過膜で濃縮後、0.6 M NaCl 及び 0.05%

Tween 20 を含む 10 mM 磷酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)で平衡化したセファクリル S-100 カラムに供して、同緩衝液で溶離した。下記の方法により各画分の酵素活性を測定し、蛋白質脱アミド活性画分を集め、限外濾過膜で濃縮し蛋白質脱アミド酵素溶液を得た。

- 5      下記の測定法 (Z-Gln-Gly を基質とする方法とカゼインを基質とする方法) で活性を測定したところ 33.7 単位/ml (Z-Gln-Gly を基質)、13.5 単位/ml (カゼインを基質) の酵素標品が得られた。

酵素活性測定法：酵素活性の測定は以下のように従い、基質としてZ-Gln-Gly 及びカゼインを使用した。

- 10      活性測定方法：10mM Z-Gln-Glyを含む176mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 100  $\mu$ l に酵素溶液10  $\mu$ lを添加して、37℃、60分間インキュベートした後、12%トリクロロ酢酸溶液100  $\mu$ lを加えて反応を停止する。遠心分離 (15000rpm、4℃、5分間) した後、上清について以下のようにF-kit ammonia (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて測定する(A1)。別に酵素溶液の代わりに水を用いて同様に  
15      して測定する(A2)。

F-kit ammonia 100  $\mu$ l 試薬 2 に上清10  $\mu$ lと水190  $\mu$ lを加え室温で5分間放置後100  $\mu$ lを用いての340nmの吸光度(E1)を測定する。残りの200  $\mu$ lに、1.0  $\mu$ lの試薬 3 (グルタメートデヒドロゲナーゼ) を加えた後、更に20分間室温に放置した後に残りの200  $\mu$ lの340nmの吸光度(E2)を測定する。

- 20      上記条件下で1分間あたり1  $\mu$ molのアンモニアを遊離する酵素量を1単位とし、以下の式に従って求める。

$$u/ml = 1.76 \times [A1(E1-E2) - A2(E1-E2)]$$

基質として 10mM Z-Gln-Gly に代えて1%カゼイン (ハマーステン、メルク社製) を用いて同様にして活性を求め、蛋白質に結合するアミド基に作用すること

- 25      を確認する。

【実施例 2】 変性  $\alpha$ -ラクトアルブミンの蛋白質脱アミド酵素による処理

$\alpha$ -ラクトアルブミン（シグマ社製）を 10 mg/ml の濃度で 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)に溶解し、実施例 1 で得られた蛋白質脱アミド酵素を 1.82  $\mu$ g/ml  
5 の濃度で添加し、42℃で振とうした。 $\alpha$ -ラクトアルブミンを変性させるために、  
変性剤（キレート剤）として 5 mM のエチレンジアミン四酢酸を添加して  
(Matsumura ら, Food Hydrocol., Vol.8, 555-566, 1994) 脱アミド化反応を行っ  
た。反応のタイムコースを図 1 に示す。この図で脱アミド化率(Degree of  
deamidation,%)は、蛋白質中の全グルタミン残基中の脱アミドされたグルタミン  
10 残基の割合を示す。全グルタミン残基数は、 $\alpha$ -ラクトアルブミンの全アミノ酸  
配列（Brew ら, J. Biol. Chem., Vol.245, 4570-4582, 1970）から求め、脱アミド  
化されたグルタミン残基数は反応中に遊離したアンモニア量から求めた。

このように、 $\alpha$ -ラクトアルブミンを変性すること（モルテン・グロビュール  
状態にする）により蛋白質脱アミド酵素による脱アミド反応が著しく促進される  
15 ことが判る。即ち、ネイティブな  $\alpha$ -ラクトアルブミンは、4 時間で 20%、24  
時間で 55%の脱アミド化率であったのに対し、変性状態（モルテン・グロビュール  
状態）の  $\alpha$ -ラクトアルブミンは 4 時間で 61%、24 時間で 66%の脱アミド化  
率であった。脱アミド化反応速度及び最終の脱アミド化率双方において、改善さ  
れている。

20

【実施例 3】 蛋白質脱アミド酵素処理を施した  $\alpha$ -ラクトアルブミンの高次構造の変化

実施例 2 で得られた種々の脱アミド化率の脱アミド化  $\alpha$ -ラクトアルブミン  
(D20:脱アミド化率 20%、D55:脱アミド化率 55%、D61:脱アミド化率 61%) の  
25 高次構造の変化を近紫外領域 CD(circular dichroism、円二色)分析を行った結果

を図 2 に示す。分析は 2 mM エチレンジアミン四酢酸(図 2 A)或いは 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (図 2 B) を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)中で行った。コントロールとして脱アミド化していない $\alpha$ -ラクトアルブミンを用いた (Native)。結果、何れの溶液中でも脱アミド化された $\alpha$ -ラクトアルブミンは 270nm 付近のスペクトラム強度が減少していた。そしてこの減少度は、脱アミド化率が上昇するにつれて大きくなっていることが判る。このことは、脱アミド化されることによって、 $\alpha$ -ラクトアルブミン中の側鎖の芳香環グループが離れたこと、即ち 3 次構造が崩れたことを意味する。そしてその 3 次構造の破壊の程度が、脱アミド化率が高くなるに従って大きくなっていることがわかる。また、一般に $\alpha$ -ラクトアルブミンはエチレンジアミン四酢酸存在下では、3 次構造が崩れた状態となり、カルシウム存在下では安定化されることが知られている(Kuwajima ら、Biochemistry, Vol.29, 8240-8249)。このことは、脱アミド化していない $\alpha$ -ラクトアルブミン (Native) のスペクトラムが、エチレンジアミン四酢酸存在下において、 $\text{CaCl}_2$  存在下に比べて大きく強度が減少していることから判る。高度に脱アミド化された $\alpha$ -ラクトアルブミンのカルシウム存在下でのスペクトラム強度 (図 2 B の D61) が、脱アミド化していない $\alpha$ -ラクトアルブミンのエチレンジアミン四酢酸存在下のスペクトラム強度 (図 2 A の Native) とほぼ同じレベルであることから、脱アミド化による 3 次構造の変化は、カルシウムの存在によってももはや安定化されないほど大きなものであることが示される。

次に同じサンプルについて、遠紫外領域 CD 分析を行った結果を図 3 に示す。分析は 2 mM エチレンジアミン四酢酸 (図 3A) 或いは 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (図 3B) を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)中で行った。この様に、何れの溶液中でも脱アミド化された $\alpha$ -ラクトアルブミンはどれも、コントロールの脱アミド化していない $\alpha$ -ラクトアルブミン (Native) とほぼ類似のスペクトラムを示した。このことは、脱アミド化された $\alpha$ -ラクトアルブミンは 2 次構造においては変化を



受けていないことを示す。

この様に、蛋白質脱アミド酵素によって脱アミド化することにより蛋白質を変性させることが出来ることが判る。また、この変性状態は、3次構造が崩れているのに対し2次構造は保持されている温和な変性状態であり、蛋白質の機能性にと

5     として好適な状態である。

【実施例4】 蛋白質脱アミド酵素処理を施した $\alpha$ -ラクトアルブミンのトリプシン分解

実施例2で得られた脱アミド化 $\alpha$ -ラクトアルブミン（脱アミド化率46.5%）  
10     を限外ろ過膜により脱塩後、10mg/mlの濃度で2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む20 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.0)に溶解し、基質蛋白質に対し重量比で100分の1量のトリプシンを加え、37℃で反応させた。コントロールとして、脱アミド化処理をしていない $\alpha$ -ラクトアルブミンに対して同様の処理を行った。0.5,1,2,4,24時間後にサンプリングしてSDS電気泳動用の緩衝液中で加熱して反応を止め、20%  
15     SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。結果を図4に示す。図に示されるように、コントロールの脱アミド化処理をしていない $\alpha$ -ラクトアルブミンをトリプシン処理した場合、4時間目までほとんどインタクトな $\alpha$ -ラクトアルブミンのバンドが変化せず、24時間で若干薄くなっているものの、低分子領域に分解されたペプチドは観察されなかった（図4A）。一方、脱アミド化された $\alpha$ -  
20     ラクトアルブミンの場合は、トリプシン処理0.5時間で既に断片化ペプチドが生成し、それと共にインタクトな $\alpha$ -ラクトアルブミンのバンドが減少し始めた。反応後1時間でかなりのインタクトな $\alpha$ -ラクトアルブミンが消失し、2時間で完全に消失した。断片化ペプチドも24時間でかなり消失しており、分解が進んでいることが判る（図4B）。

25     この様に、蛋白質脱アミド酵素によって脱アミド化して蛋白質を変性させるこ

とにより、目的の蛋白質の蛋白質分解酵素による分解を促進する事が出来る。

#### 産業上の利用の可能性

- 以上説明したように、蛋白質中のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を用いて蛋白質の脱アミド反応を行う際に、脱アミド化される蛋白質として変性蛋白質を用いることにより、脱アミド化速度及び脱アミド化率を著しく改善することが出来る。また、蛋白質中のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を用いて蛋白質の脱アミド反応を行うことにより、
- 5 蛋白質分解酵素に対する感受性の高い状態に変性させることができる。この変性方法は、従来知られていない酵素的蛋白質変性方法であるため、従来の物理的又は化学的な蛋白質変性方法では困難であった、副反応が生ずることを回避することが可能となる。また、本発明の変性方法により得られる蛋白質は蛋白質分解酵素感受性が高いため、これを原料として蛋白分解物を効率よく製造することが可能となる。また、本発明の方法では温和な条件により蛋白質を変性することができるため、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性などの機能が向上した蛋白質を得ることができるという利点もある。
- 10
- 15

請 求 の 範 囲

1. 変性乳蛋白質に、蛋白質のアミド基に直接作用してペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させる、ことを特徴とする乳蛋白質の脱アミド化方法。
- 5 2. 前記酵素が分子量 5,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の方法。
3. 前記酵素が分子量 10,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の方法。
4. 前記酵素が微生物由来である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項～第  
10 3 項のいずれかに記載の方法。
5. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属に属する、ことを特徴  
15 とする請求の範囲第 4 項に記載の方法。
6. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属に属するクリセオバクテリウム・エスピー (*Chryseobacterium* sp.) No.9670 (FERMBP-7351) である、ことを特徴とする請求の範囲第 4 項に記載の方法。
7. 前記変性乳蛋白質が、熱、圧力、酸、アルカリ、変性剤、酸化剤、還元  
20 剤、及びキレート剤よりなる群から選択される一又は二以上による変性処理により得られた変性乳蛋白質である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかに記載の方法。
8. 乳蛋白質を変性させるステップ、及び  
前記ステップで得られる変性乳蛋白質に、蛋白質のアミド基に直接作用しペ  
25 チド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用

させて前記変性乳蛋白質を脱アミド化するステップ、を含むことを特徴とする脱アミド化乳蛋白質の製造方法。

9. 前記酵素が分子量 5,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素である、ことを特徴とする請求の範囲第 8 項に記載の方法。

5 10. 前記酵素が分子量 10,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素である、ことを特徴とする請求の範囲第 8 項に記載の方法。

11. 前記酵素が微生物由来である、ことを特徴とする請求の範囲第 8 項～10 項のいずれかに記載の方法。

12. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属に属する、ことを特徴とする請求の範囲第 11 項に記載の方法。

13. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属に属する  
15 クリセオバクテリウム・エスピー (*Chryseobacterium* sp.) No.9670 (FERM BP-7351) である、ことを特徴とする請求の範囲第 11 項に記載の方法。

14. 前記変性させるステップが、熱、圧力、酸、アルカリ、変性剤、酸化剤、還元剤、及びキレート剤よりなる群から選択される一又は二以上による処理  
20 からなる、ことを特徴とする請求の範囲第 11 項～第 13 項のいずれかに記載の方法。

15. 乳蛋白質に、蛋白質のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素を作用させる、ことを特徴とする乳蛋白質の変性方法。

25 16. 前記酵素が分子量 5,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素

である、ことを特徴とする請求の範囲第 15 項に記載の方法。

17. 前記酵素が分子量 10,000 以上の蛋白質に対して前記作用を有する酵素である、ことを特徴とする請求の範囲第 15 項に記載の方法。

18. 前記酵素が微生物由来である、ことを特徴とする請求の範囲第 15 項  
5 ～第 17 項のいずれかに記載の方法。

19. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボ  
バクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、  
スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム  
(*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属に属する、ことを特徴  
10 とする請求の範囲第 18 項に記載の方法。

20. 前記微生物がクリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属に属する  
クリセオバクテリウム・エスピー (*Chryseobacterium* sp.) No.9670 (FER  
M BP-7351) である、ことを特徴とする請求の範囲第 18 項に記載の方  
法。

15 21. 請求の範囲第 15 項～第 20 項のいずれかに記載の方法により蛋白質  
を変性させるステップ、及び前記ステップで得られる変性蛋白質に蛋白質分解酵  
素を作用させるステップを含むことを特徴とする蛋白質分解物の製造法。

### 要 約 書

蛋白質中のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する酵素によって乳蛋白質を脱アミドする場合に、その脱アミド化率及び脱アミド化速度を改善する方法を提供する。また、乳蛋白質の

#### 5 酵素的変性方法を提供する。

予め変性させた乳蛋白質に、分子量 5000 以上の蛋白質中のアミド基に直接作用しペプチド結合の切断及び蛋白質の架橋を伴わず脱アミドする作用を有する蛋白質脱アミド酵素を作用させて脱アミド化を行う。また、当該酵素を用いて乳蛋白質の変性を行う。

Fig. 1

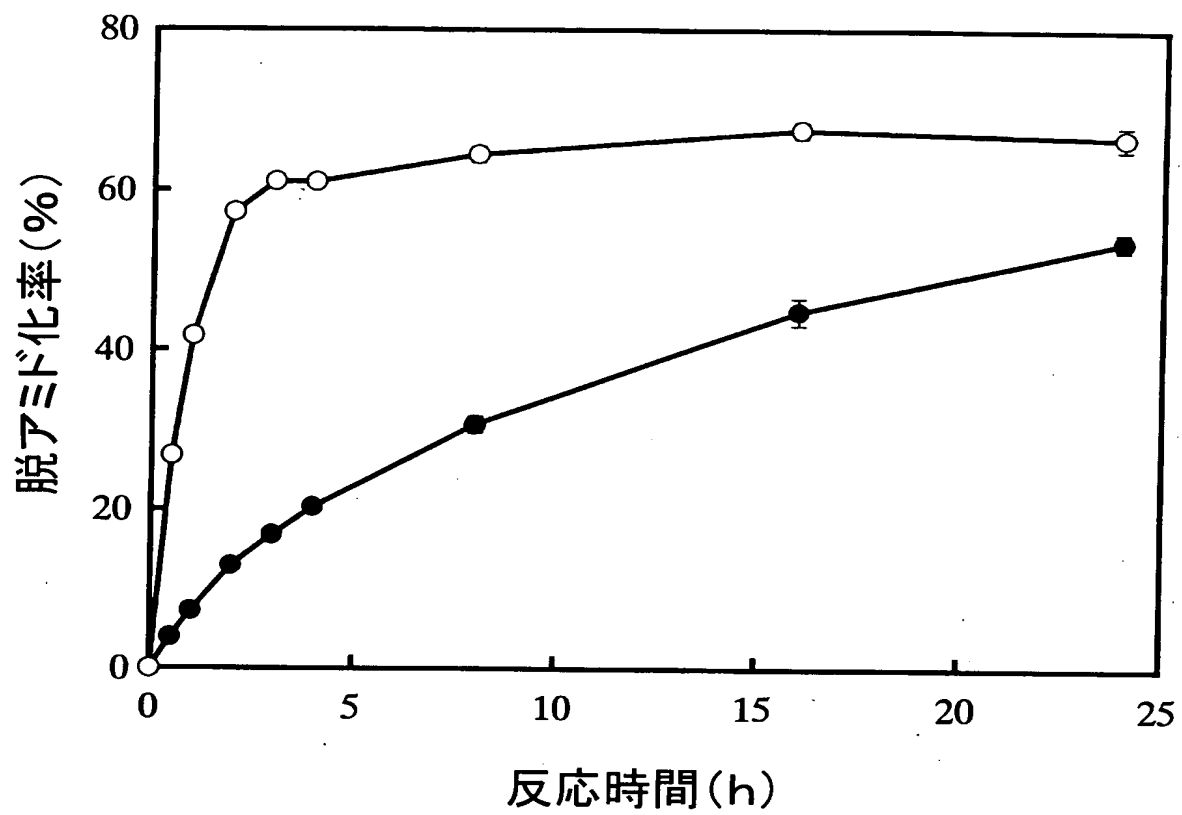


Fig. 2

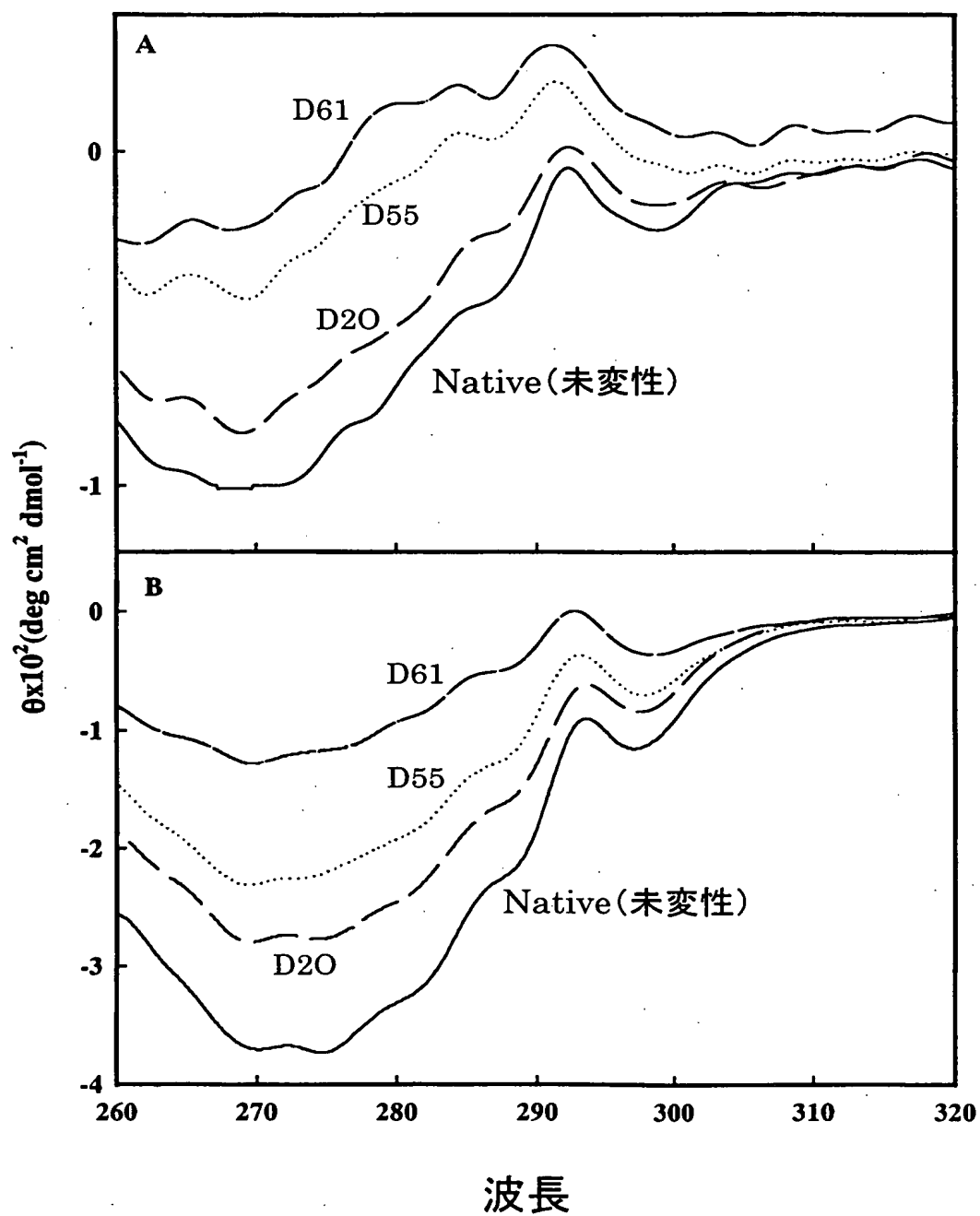




Fig. 2

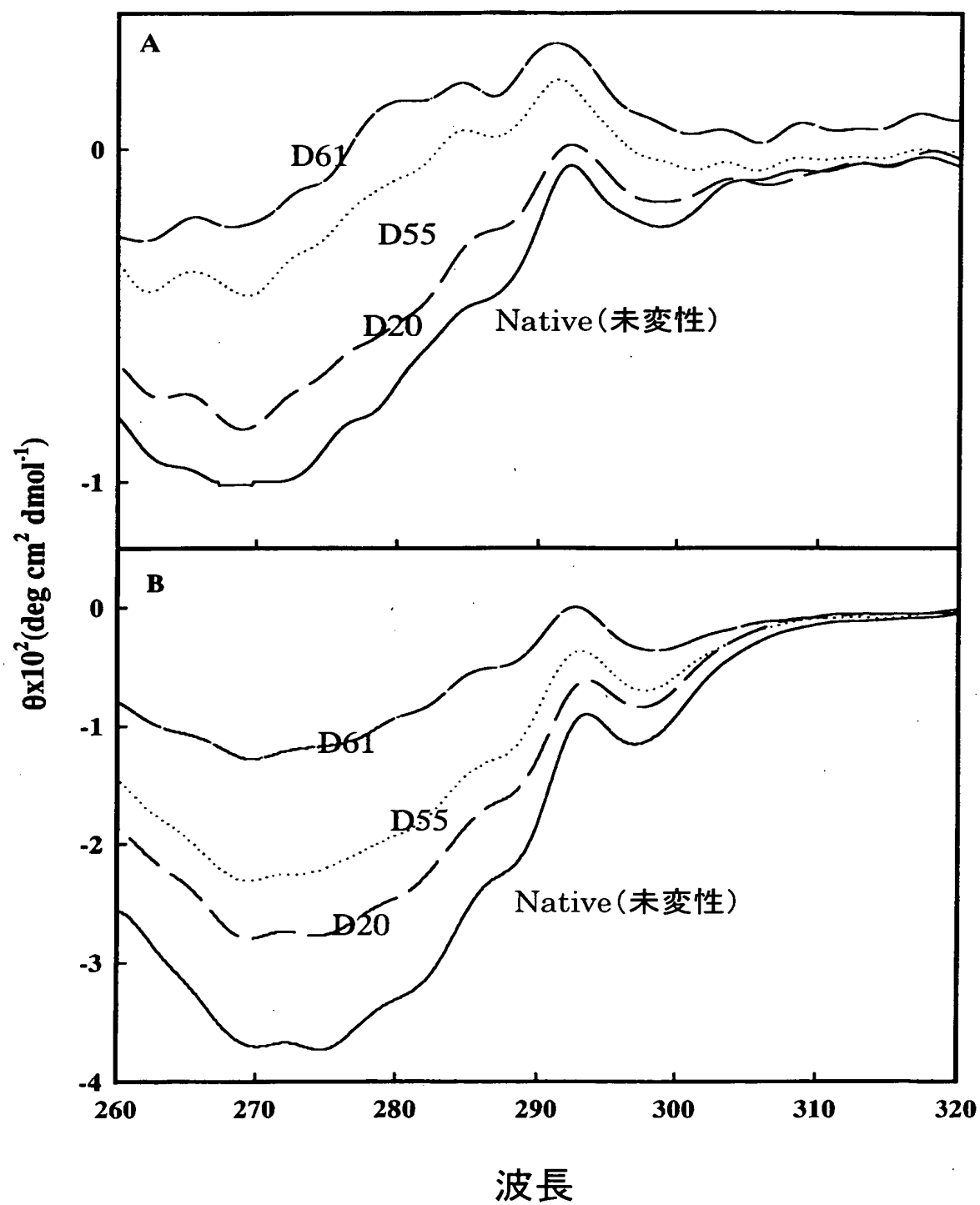


Fig. 3

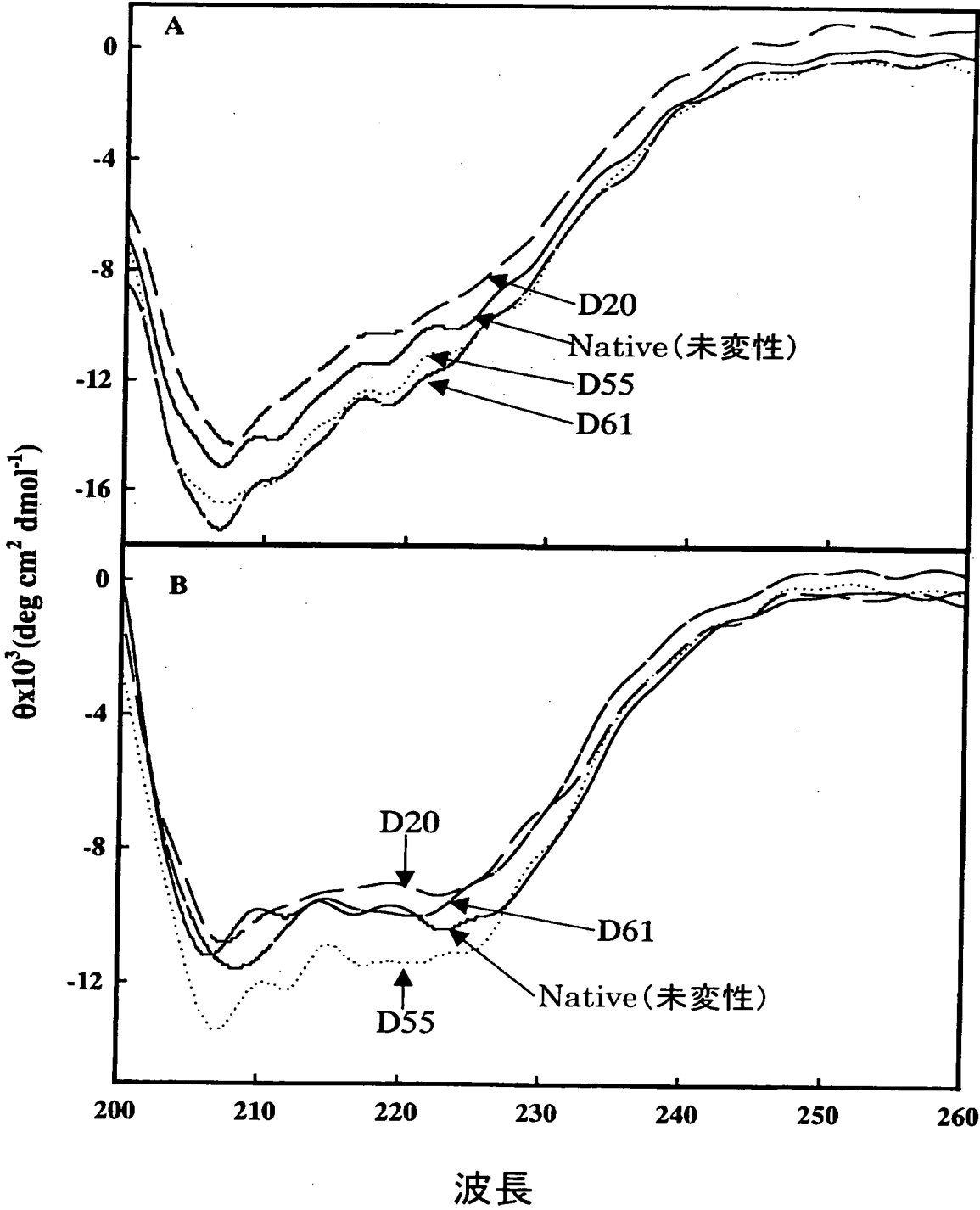


Fig. 4

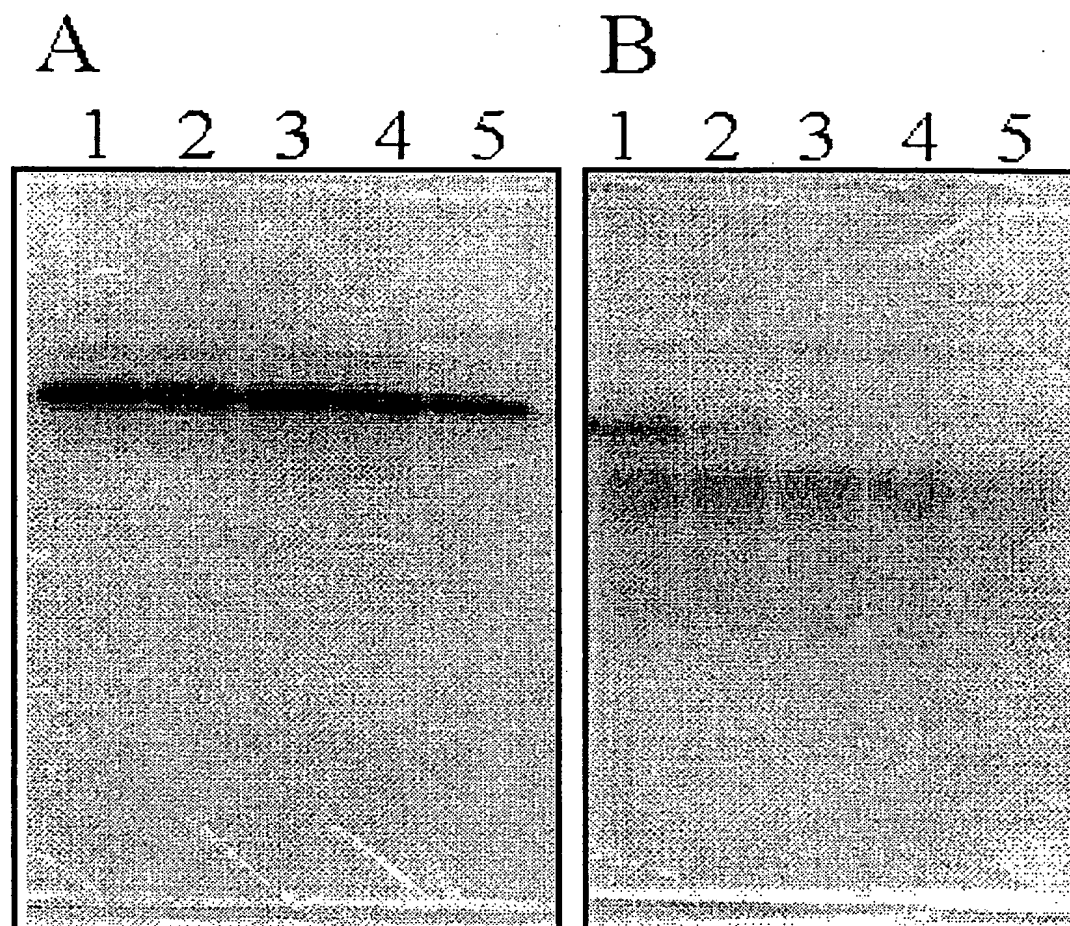


Fig. 4

